

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-250067

(43)Date of publication of application : 05.10.1989

(51)Int.Cl.

G01N 33/569
G01N 33/50
G01N 33/577

(21)Application number : 63-074558

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 30.03.1988

(72)Inventor : NABESHIMA KOUZOU

(54) DETECTION OF STREPTOCOCCUS MUTANS

(57)Abstract:

PURPOSE: To surely detect the presence or absence or quantity of Streptococcus mutans by bringing the monoclonal antibody to the Streptococcus mutans or the polyclonal antibody obtained by immunizing this antigen with an animal into reaction with a sample to be inspected.

CONSTITUTION: The antigen specific to the Streptococcus mutans and the monoclonal antibody to a serum type specific polysaccharide antigen or the polyclonal antibody obtained by immunizing this antigen with a mammal or birds are brought into reaction with the sample to be inspected and whether the antigen corresponding to the antibody exists in the sample to be inspected or not is decided by the presence or absence of an antigen-antibody reaction. Proper bacteria of either (a) type bacteria or (h) type bacteria are selectively used according to purposes for the serum type specific polysaccharide antigen of the Streptococcus mutans and the monoclonal antibody and polyclonal antibody for this antigen are obtainable according to the conventional practice.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-250067

⑬ Int. Cl.⁴

G 01 N 33/569
33/50
33/577

識別記号

庁内整理番号

C-7906-2G

G-7055-2G

B-7906-2G 審査請求 未請求 請求項の数 1 (全11頁)

⑭ 公開 平成1年(1989)10月5日

⑮ 発明の名称 ストレプトコッカス・ミュータンスの検出方法

⑯ 特 願 昭63-74558

⑰ 出 願 昭63(1988)3月30日

⑱ 発 明 者 鍋 嶋 詢 三 神奈川県小田原市矢作147-49

⑲ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

⑳ 代 理 人 弁理士 小島 隆司

明 細 書

1. 発明の名称

ストレプトコッカス・ミュータンスの
検出方法

2. 特許請求の範囲

1. ストレプトコッカス・ミュータンスに対するモノクローン抗体又はこの抗原を動物に免疫することによって得られるポリクローン抗体を被検試料と反応させて、この被検試料中に上記抗体に対応する抗原が存在するか否かを抗原抗体反応の有無により判定することを特徴とするストレプトコッカス・ミュータンスの検出方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、唾液や歯垢などの被検試料中のストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡を検出する方法に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

従来より、ストレプトコッカス・ミュータンス

(*Streptococcus mutans*)はう蝕原性細菌として注目され、ストレプトコッカス・ミュータンスがヒト及び動物の実験う蝕の誘発に極めて重要な役割を果たしていることは広く知られているところである。

ストレプトコッカス・ミュータンスは、血清学的特異性に基づいてaからhまでの8つの異なる血清型(serotype)に分類されている。このうち、ヒト口腔内からはc, d, e, f, gの5型が分離され、特にc型菌の分離頻度は全分離株の70~80%にも及ぶ。また、DNAホモロジーに基づいた分類法によれば、c, e, f型菌は互に酷似した性状を示す。一方、d, g型菌は血清学的交叉反応も強く、DNAホモロジーも同一といえる。従って、ヒト口腔内から分離されるストレプトコッカス・ミュータンスは、c, e, f型菌のグループと、d, g型菌のグループに分けることができ、このため最近ではc, e, f型菌を狭義のストレプトコッカス・ミュータンスといひ、d, g型菌をストレプトコッカス・ソブリヌ

ス(*Streptococcus sobrinus*)と呼称することも多い(なお、本発明において、ストレプトコッカス・ミュータンスはかかる狭義の意味ではなく、広義の意味で用いる)。

このように、ストレプトコッカス・ミュータンスはう蝕罹患にとって重要な細菌であるが、従来、ストレプトコッカス・ミュータンスを直接の指標としてう蝕の活動度やう蝕罹患の危険度を予知する実用的なう蝕診断方法は提案されていない。

従来もストレプトコッカス・ミュータンスを直接分離、固定することは十分可能であるが、しかしこれには特殊の設備と熟練を必要とし、一般の歯科診療室で実施するのは困難である。

本発明は上記事情に鑑みなされたもので、唾液や歯垢などの被検試料(検体)中のストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡を短時間にかつ特異的に検索することができ、従ってう蝕の活動度、う蝕罹患リスクを簡単かつ確実に予測することができるストレプトコッカス・ミュータンスの検出方法を提供することを目的とする。

するモノクローン抗体又はこの抗原を哺乳動物や鳥類に免疫することによって得られるポリクローン抗体を被検試料と反応させて、この被検試料中に上記抗体に対応する抗原が存在するか否かを抗原抗体反応の有無により判定することと特徴とするものである。

ここで、ストレプトコッカス・ミュータンスの血清型特異多糖抗原は、その目的に応じてa型菌からh型菌のうち適宜なものが選択使用され、またこの抗原に対するモノクローン抗体やポリクローン抗体は常法に従って得ることができ、例えばモノクローン抗体は細胞融合法等を採用して調製することができる。また、ポリクローン抗体は、上記抗原を哺乳動物又は鳥類に免疫することによって得られるが、この場合哺乳動物としてはウサギ、鳥類としてはニワトリなどが好適に用いられる。なお、本発明においては、このように抗原を哺乳動物又は鳥類に免疫することによって得られる抗体を含む抗血清或いは乳や卵黄分画物をそのまま使用するようにしてもよく、またこれから抗

(課題を解決するための手段及び作用)

本発明者は、上記目的を達成するため検討を重ねた結果、ストレプトコッカス・ミュータンスの血清学的特異性を利用し、その特異的な抗原、血清型特異多糖抗原に対するモノクローン抗体やウサギ等の動物のポリクローン抗体を使用し、これを被検試料と反応させることにより、この被検試料中に上記抗体に対応するストレプトコッカス・ミュータンスの血清型特異抗原が存在すれば、凝集反応等の抗原抗体反応が生じ、従ってかかる反応の有無、凝集等の程度を判定すれば、特殊な測定機器を用いなくてもストレプトコッカス・ミュータンスの存否や多寡を容易に検出することができ、ストレプトコッカス・ミュータンスの感染の程度を決定し得ることを知見し、本発明をなすに至ったものである。

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明のストレプトコッカス・ミュータンスの検出方法は、ストレプトコッカス・ミュータンスに特異的な抗原ないしは血清型特異多糖抗原に対

体を分離して用いてもよい。この場合、抗体の分離、精製は常法によって行なうことができる。

本発明は上記モノクローン抗体やポリクローン抗体を検査薬として使用するものであるが、これらのモノクローン抗体やポリクローン抗体は適宜な担体に担持させて用いることが好ましい。担体は種々選定されるが、ラテックスビーズの使用が好適であり、ラテックスビーズを上記抗体で感作して用いるのが好ましい。ラテックスビーズとしては、ポリスチレンタイプのもの、カルボキシン酸性タイプのもの、極低カルボン酸タイプのものなどがあるが、本発明においてはこれらのいずれのものをも使用することができる。また、ラテックスビーズの粒径は適宜選択することができるが、0.1~100 μ mのものを使用することが好ましい。なお、これらのラテックスビーズは市販されており、市販品として例えば日本合成ゴム社製G2801、V0706、SFL140-L、米国シグマ社製LB1、LB3、LB5、LB6、LB8、LB11、LB16、LB30、SD6、

SD26、SD91、CLB4、CLB9などを使用することができる。

上記抗体でラテックスビーズを感作する方法としては、物理吸着法や化学結合法が採用し得る。

物理吸着法は常法によって行なうことができるが、この場合ラテックスビーズの感作に用いる抗体は250～1000倍程度に希釈したものが好ましく、また抗体の希釈に用いる希釈液としては、グリシン緩衝生理食塩水、蒸留水などが好適に用いられる。

また、化学結合法も常法に従って行なうことができるが、感作に使用する抗体は、蒸留水などの希釈液で250～1000倍程度に希釈したものが好ましい。

本発明は、上記抗体、特に上記抗体で感作したラテックスビーズを検査薬として唾液、歯垢等の被検試料と反応させるもので、これにより被検試料中に上記抗体に対応する血清型のストレプトコッカス・ミュータンスが存在すれば、凝集等を生じるので、その抗原抗体反応の有無、凝集等の程

度を判定することにより、被検試料中に検出しようとする血清型のストレプトコッカス・ミュータンスが存在しているか否か、或いはどの程度存在しているかを判断することができるものである。

ここで、被検試料中のストレプトコッカス・ミュータンスを検出してヒトのう蝕の活動度やう蝕罹患の危険性を一般的に診断する場合は、抗体としてc、d、e、f、g型菌を抗原とすることにより得られたもの、特にo型菌とg型菌とを抗原とすることにより得られたものを使用するのが好ましい。またこの場合、o型菌を由来とする抗体とg型菌を由来とする抗体とを適宜割合、望ましくは前者と後者とを重量比で1:100～100:1の割合で混合した検査薬を使用することが好ましく、更に、被検試料はそのまま又は凍結乾燥したもの(ストレプトコッカス・ミュータンスの生菌又は凍結乾燥菌)を使用することが好ましく、これにより被検試料中にc、d、e、f、g型菌のいずれかが存在すれば、これを検知することができる。なお、被検試料は必要に応じて蒸留水や

リン酸緩衝生理食塩水などで適宜希釈することができる。

また、被検試料中のストレプトコッカス・ミュータンスの血清型をも明確に検出する必要がある場合は、上記被検試料を熱水抽出処理したり酸抽出処理し、被検試料中のストレプトコッカス・ミュータンスを熱水抽出物(ランツェランダー抗原)或いは酸抽出物(亜硝酸抽出抗原等)として用いるようにすることが好ましく、これにより、上に述べたように血清型をより特異的に検出することができる上、その血清型のストレプトコッカス・ミュータンス存在量が少ない場合でも感度よく検出することができる。なお、熱水抽出や酸抽出は常法に従って行なうことができる。

被検試料中にストレプトコッカス・ミュータンスが存在しているか否かの確認は、上述したように抗原抗体反応の有無によって検知することができる。かかる抗原抗体反応の有無は従来知られている適宜な検知手段によることができるが、一般的には凝集反応の有無、凝集の程度を判断すること

(発明の効果)

本発明によれば、唾液や歯垢などの被検試料中のストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡を簡単かつ短時間で確実に検出でき、従ってこれからう蝕の活動度、う蝕罹患の危険性を容易に予知することができる。

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明する。

(実施例1)

下記方法により免疫グロブリン、感作ラテックスビーズ、抗原(被検試料)を調製した。

免疫グロブリンの調製

ストレプトコッカス・ミュータンス(以下、S.

mutansと記述する)10449株(血清型o)の凍結乾燥菌体を1mg/mlの割合で生理食塩水に懸濁浮遊させたものをウサギに静脈注射して免疫した。その後、常法により採血し、血清を分離した。

得られた抗*S. mutans*血清型o血清を50%飽和硫酸アンモニウムで塩析した後、原血清量の1/3量になるように生理食塩水に溶解させ、生理食塩水に対し遠心し、ウサギ抗*S. mutans* o型免疫グロブリン(以下、単に抗o型抗体と記述する)を調製した。

また、同様の免疫操作を*S. mutans* 6715株(血清型g)について行ない、ウサギ抗*S. mutans* g型免疫グロブリン(抗g型抗体)を調製した。

感作ラテックスビーズの調製

下記A~Dのラテックスビーズをグリシン緩衝生理食塩水中に0.5%濃度となるように懸濁させ、その1容量部に上記免疫グロブリンのグリシン緩衝生理食塩水希釈溶液1容量部を混合し、37℃で90分間攪拌反応させた。反応終了後、25℃において3700rpmで10分間遠心して得

沈渣を0.1%のウシ血清アルブミン(Difco社製)を含んだリン酸緩衝生理食塩水2量部で洗浄反応することにより、非特異反応を防止するためにラテックスビーズの未吸着部位を被覆した。次いで上記と同様に遠心して得たラテックスビーズをウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.5%の割合でウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水に浮遊させたものを感作ラテックスビーズとした。

A: ポリスチレンタイプラテックスビーズ(日本合成ゴム社製G2801, 粒径0.876 μ m)

B: カルボキシ変性タイプラテックスビーズ(同社製VO706)

C: 極低カルボン酸タイプラテックスビーズ(同社製SFL140L-3, 粒径約1 μ m)

D: 極低カルボン酸タイプラテックスビーズ(同社製SFL140L-6, 粒径約1 μ m, ラテックスビーズCよりわずかに表面荷電量が小さいもの)

抗原(被検試料)の調製

1. ランツランダー(Rantz-Randall)抗原
S. mutans E49(血清型a), *S. mutans* FA-1(血清型b), *S. mutans* 10449(血清型c), *S. mutans* B13(血清型d), *S. mutans* MT703R(血清型e), *S. mutans* OMZ175(血清型f), *S. mutans* 6715(血清型g)及び*S. mutans* MFe28(血清型h)の各凍結乾燥菌体20mgをそれぞれ生理食塩水1mlに懸濁し、121℃で20分間加熱した後、遠心して得た上清をランツランダー抗原(以下、RR抗原と記述する)として用いた。

2. 全菌体浮遊抗原

上記各*S. mutans*の凍結乾燥菌体10mgを生理食塩水1mlに懸濁したものを全菌体浮遊抗原として用いた。

3. 生菌浮遊抗原

S. mutans 10449(血清型o)及び*S. mutans* 6715(血清型g)を1gのブレイン・ハート・イフュージョンブロス(brain heart infusion broth, Difco社製)を用いて37℃で18時間培養した

後、遠心によって集菌し、生理食塩水で2回洗浄し、生理食塩水で550nmの濁度(OD₅₅₀=1.0)となるように希釈した。これを所定倍段階に希釈したものを生菌浮遊抗原として用いた。

なお、生菌浮遊抗原は、ミティス・サリバリウス寒天平板に播種して生菌数を算出すると共に、凍結乾燥後の重量を求め、生菌数と凍結乾燥菌体重量との関係を求めた。

4. 凍結乾燥菌体及び生菌体の亜硝酸抽出抗原

4規定亜硝酸ナトリウム50 μ lと氷酢酸50 μ lとを混和した後、上記*S. mutans*の凍結乾燥菌体及び生菌体の浮遊抗原100 μ lを加え、室温において5分間抽出した。反応後、4規定NaOH200 μ lを加えてpHを6.5~7.0に中和調整し、これを亜硝酸抽出抗原として用いた。

次に、上記感作ラテックスビーズ(検査薬)を用い、下記方法によって上記抗原液(被検試料)と反応させ、凝集の程度を調べることににより、*S. mutans*との反応性を評価し、上記検査薬の有効性を調べた。

感作ラテックスビーズ凝集試験

感作ラテックスビーズ懸濁液 30 μl と抗原液 3 μl とをスライドガラス上で混和した後、約 2 分 30 秒間隔で 10 秒間攪拌し、反応を開始してから 5、10、15 及び 20 分後の凝集の程度を下記基準に従って 5 段階に評価した。

凝集の判定基準

- ;凝集を認めない
- ± ;辺縁部にわずかに小さな凝集を認める
- +
 ;全体にわたり小さな凝集を認める
- ++ ;大きな凝集が出現し、白濁が減少する
- +++ ;凝集のみとなり、白濁が消失する

試験結果

1. 免疫グロブリン濃度の影響

免疫グロブリンを 125、250、500、1000、2000、4000 及び 8000 倍にグリシン緩衝生理食塩水を用いて希釈し、上記のようにしてラテックスビーズ A の感作を行ない、感作ラテックスビーズを得た。

次に、抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ A に対

しては c 型菌の RR 抗原の原液、抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ A に対しては g 型菌の RR 抗原の 2⁷ 倍希釈したものを用いて感作ラテックスビーズ凝集試験を行なった。

結果を第 1、2 表に示す。

第 1、2 表の結果から、抗 c 型抗体及び抗 g 型抗体感作ラテックスビーズのいずれも 500 倍に希釈した免疫グロブリンにより感作されたときに対応抗原によって誘発される凝集反応の感度が最も高いことが認められた。

第 1 表 抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ

免疫グロブリン 希釈率	RR 抗原 (c 型, 原液)			
	反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20
1/125	—	—	—	—
1/250	—	++	++	++
1/500	+	++	++	+++
1/1000	+	+	+	+
1/2000	—	—	—	—
1/4000	—	—	—	—
1/8000	—	—	—	—

第 2 表 抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ

免疫グロブリン 希釈率	RR 抗原 (g 型, 2 ⁷ 倍希釈)			
	反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20
1/125	—	—	—	—
1/250	—	±	+	++
1/500	—	++	+++	+++
1/1000	—	—	—	±
1/2000	—	—	—	—
1/4000	—	—	—	—
1/8000	—	—	—	—

2. ラテックスビーズの相違による影響

500 倍に希釈された免疫グロブリンを用いてラテックスビーズ A～D をそれぞれ感作し、これら感作ラテックスビーズを RR 抗原の段階希釈液と反応させた。

結果を第 3、4 表に示す。

第 3、4 表の結果より抗 c 型抗体及び抗 g 型抗体で感作されたラテックスビーズの反応性はラテックスビーズの種類により殆んど影響を受けないものであることが認められた。

第 3 表 抗o型抗体感作ラテックスビーズ

RR抗原(o型) 希釈率	ラテックスビーズA				ラテックスビーズB				ラテックスビーズC				ラテックスビーズD			
	反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
原 液	-	±	+	++	-	±	++	+++	+	+	++	+++	±	+	++	+++
2 ⁻¹	-	±	+	++	-	±	++	++	±	+	++	+++	±	+	++	+++
2 ⁻²	-	±	+	++	-	±	++	++	-	±	±	++	±	+	++	+++
2 ⁻³	-	±	+	+	-	±	++	++	-	±	+	+	±	±	++	++
2 ⁻⁴	-	±	+	+	-	±	+	+	-	±	±	+	±	±	++	++

第 4 表 抗g型抗体感作ラテックスビーズ

RR抗原(g型) 希釈率	ラテックスビーズA				ラテックスビーズB				ラテックスビーズC				ラテックスビーズD			
	反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
2 ⁻¹	±	±	+	+	-	±	±	±	-	++	++	++	±	+	+	++
2 ⁻²	±	+	++	+++	±	±	+	++	±	+++	+++	+++	±	+	++	+++
2 ⁻³	±	++	+++	+++	±	+	++	+++	+	++	+++	+++	±	++	+++	+++
2 ⁻⁴	±	++	+++	+++	±	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++
2 ⁻⁵	±	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
2 ⁻⁶	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
2 ⁻⁷	±	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	+++	+++	+++
2 ⁻⁸	±	++	+++	+++	+	+	++	+++	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++

3. 各種抗原の血清型の影響

500倍に希釈された免疫グロブリンで感作したラテックスビーズAと種々の血清型に属する *S. mutans* の全菌体浮遊抗原、1.25 mg/ml の凍結乾燥菌体を含む亜硝酸抽出抗原、及びRR抗原の原液と2[×]倍希釈液とをそれぞれ用い、感作ラテックスビーズ凝集試験を行なった。結果を第5～8表に示す。

また、500倍に希釈された免疫グロブリンで感作したラテックスビーズAと、抗原としてストレプトコッカス・ピオジェネス(*S. pyogenes*)の2株、ストレプトコッカス・サンギス(*S. sanguis*)の4株、ストレプトコッカス・サリバリウス(*S. salivarius*)の1株、ストレプトコッカス・フェカーリス(*S. faecalis*)の1株の10 mgを生理食塩水1 mlに懸濁した全菌体浮遊抗体とを用い、感作ラテックスビーズ凝集試験を行なった。結果を第9表に示す。

第5～9表の結果から認められるように、抗o型抗体感作ラテックスビーズは、血清型o、e及

びfの全菌体浮遊抗原と約10分間の反応で明瞭な凝集反応を生じ、また抗g型抗体感作ラテックスビーズは血清型a及びgの全菌体浮遊抗原と凝集反応を生じた。

従って、抗o型抗体及び抗g型抗体を用い、特にこれらを混合して使用することにより、唾液や歯垢から採取した検体中の *S. mutans* の存否を該 *S. mutans* の血清型の如何に拘らず検出し得ることが認められた。

一方、全菌体を抽出処理することによって得られた亜硝酸抽出抗原やRR抗原を使用した場合、抗o型抗体や抗g型抗体との特異性が高まり、従って検体中の *S. mutans* の血清型をも検知するためにはRR抗原や亜硝酸抽出抗原の使用が好ましいことが認められた。

なお、第8表の結果は、抗o型及び抗g型抗体が *S. pyogenes* 19618の全菌体浮遊抗原に対し弱い交叉凝集反応を生じることを示しているが、*S. pyogenes* 19618のRR抗体や亜硝酸抽出抗体を用いる場合には、かかる交叉反応は生じな

いものである。

第5表 抗o型抗体感作ラテックスビーズ

菌体 (血清型)	全菌体浮遊抗原				亜硝酸抽出抗原			
	反応時間 (分)				反応時間 (分)			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>S. mutans</i> 849 (a)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> PA-1 (b)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> 10449 (c)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> B13 (d)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> MT703R (e)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> OH2175 (f)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> 6715 (g)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> Wfc28 (h)	+	+	+	+	+	+	+	+

第 5 表 抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ

菌 体 (血清型)	全菌体浮遊抗原				亜硝酸抽出抗原			
	反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>S. mutans</i> E49 (a)	++	+++	+++	+++	-	+	+	+
<i>S. mutans</i> FA-1 (b)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 10449 (c)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> B13 (d)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> NT703R (e)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> ONZ175 (f)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 6715 (g)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> MFe28 (h)	-	-	-	-	-	-	-	-

第 9 表

菌 体	抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ				抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ			
	反 応 時 間 (分)				反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>S. mutans</i> 10449 (c)	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+
<i>S. mutans</i> 6715 (g)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> 15613	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> Sv	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saequia</i> SSF-43	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saequia</i> ST-3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saequia</i> B220	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saequia</i> MDT	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i> RHT	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. faecalis</i> 476	-	-	-	-	-	-	-	-

時間平 1-250067 (8)

第 7 表 抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ

菌 体 (血清型)	R R 抗原 (原液)			
	反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20
<i>S. mutans</i> E49 (a)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> FA-1 (b)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 10449 (c)	-	±	++	++
<i>S. mutans</i> B13 (d)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> NT703R (e)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> ONZ175 (f)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 6715 (g)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> MFe28 (h)	-	-	-	-

第 8 表 抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ

菌 体 (血清型)	R R 抗原 (2 ³ 希釈)			
	反 応 時 間 (分)			
	5	10	15	20
<i>S. mutans</i> E49 (a)	-	-	±	±
<i>S. mutans</i> FA-1 (b)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 10449 (c)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> B13 (d)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> NT703R (e)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> ONZ175 (f)	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> 6715 (g)	++	+++	+++	+++
<i>S. mutans</i> MFe28 (h)	-	-	-	-

4. 各種抗原の濃度の影響

500 倍に希釈した免疫グロブリンで感作されたラテックスビーズ A と、殺菌希釈された全菌体浮遊抗原、亜硝酸抽出抗原及び生菌浮遊抗原とを用い、感作ラテックスビーズ凝集試験を行なった。結果を第 10～13 表に示す。

第 10、11 表に示されたように、抗 c 型抗体及び抗 g 型抗体感作ラテックスビーズは、いずれも 2.5 mg/ml 濃度の血清型 c の全菌体浮遊抗原まで凝集反応を生じ、また亜硝酸抽出抗原を用いた場合には 0.31 mg/ml の濃度まで凝集反応を生じ、感度が 2³ 倍向上することが認められた。

また、第 12、13 表の結果からも、亜硝酸抽出抗原の使用は感度を向上させることが知見された。

第 10 表 抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ

S. mutans 10449(c) 全菌濃度 (mg/ml)	全菌体浮遊抗原					至弱酸抽出抗原				
	反応時間(分)					反応時間(分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
10.0	++	+++	+++	+++	+++					
5.0	±	++	+++	+++	+++					
2.5	±	++	++	++	++					
1.3	±	±	+	+	+		++	++	++	++
0.63	-	-	-	-	-		±	+	++	++
0.31	-	-	-	-	-		±	±	±	±
0.16	-	-	-	-	-		-	-	-	-

第 12 表 抗 c 型抗体感作ラテックスビーズ

S. mutans 10449(c) 生菌濃度 (CFU/ml)	生菌体浮遊抗原					至弱酸抽出抗原				
	反応時間(分)					反応時間(分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
1.5 × 10 ⁸	+++	+++	+++	+++	+++					
7.6 × 10 ⁸	±	++	+++	+++	+++					
3.8 × 10 ⁸	±	±	++	++	++					
1.9 × 10 ⁸	-	-	±	±	±		++	+++	+++	+++
9.6 × 10 ⁷	-	-	-	-	-		++	+++	+++	+++
4.78 × 10 ⁷	-	-	-	-	-		±	+	++	++
2.4 × 10 ⁷	-	-	-	-	-		-	±	±	±

第 11 表 抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ

S. mutans 6715 (g) 全菌濃度 (mg/ml)	全菌体浮遊抗原					至弱酸抽出抗原				
	反応時間(分)					反応時間(分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
10.0	++	+++	+++	+++	+++					
5.0	++	++	+++	+++	+++					
2.5	±	±	+	+	+		++	++	++	++
1.3	±	±	±	±	±		++	++	++	++
0.63	-	-	-	-	-		±	±	±	±
0.31	-	-	-	-	-		±	±	±	±
0.16	-	-	-	-	-		-	-	-	-

第 13 表 抗 g 型抗体感作ラテックスビーズ

S. mutans 6715 (g) 生菌濃度 (CFU/ml)	生菌体浮遊抗原					至弱酸抽出抗原				
	反応時間(分)					反応時間(分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
1.0 × 10 ⁸	++	++	+++	+++	+++					
5 × 10 ⁷	+	+	++	++	++					
2.5 × 10 ⁷	-	±	+	+	+					
1.25 × 10 ⁷	-	-	±	±	±		±	+	++	++
6.25 × 10 ⁶	-	-	-	-	-		-	-	±	±

〔実施例2〕

実施例1で用いた物理吸着法による感作ラテックスビーズ（抗 α 型抗体、抗 β 型抗体をグリシン緩衝生理食塩水で希釈したもので感作したラテックスビーズ（以下、GBS希釈による抗 α 型又は抗 β 型抗体感作ラテックスビーズと記述する）と、化学結合法による抗 β 型抗体感作ラテックスビーズ、蒸留水希釈d吸収抗 α 型抗体感作ラテックスビーズとの効果を比較した。

結果を第14～16表に示す。

化学結合法による抗 β 型抗体感作ラテックスビーズの調整

ラテックスビーズAを蒸留水中に0.5%濃度になるように懸濁させ、その1容量部に0.1モルWSC(water soluble carbamide, 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド-ハイドロクロライド)溶液1容量部を加え、37℃で2時間培養した後、25℃において7000rpmで10分間遠心した。沈澱を蒸留水2容量部で洗浄し、上記と同様に遠心して得たラテックス

ビーズに蒸留水で希釈した免疫グロブリン（抗 β 型抗体）1容量部を加え、37℃で2時間培養した。上記と同様に遠心した後、0.1%のウシ血清アルブミンと0.05%のNaN₃を含むリン酸緩衝生理食塩水2容量部で洗浄し、更に上記と同様に遠心し、沈澱を0.1%のウシ血清アルブミンと0.05%NaN₃を含むリン酸緩衝生理食塩水1容量部に浮遊したものを感作ラテックスビーズとした。

蒸留水希釈d吸収抗 α 型抗体感作ラテックスビーズの調整

ラテックスビーズAを蒸留水中に0.5%濃度になるように懸濁させ、その1容量部に蒸留水で希釈した免疫グロブリン（抗 α 型抗体）1容量部を加え、37℃で2時間培養した。25℃において7000rpmで10分間遠心した後、0.1%のウシ血清アルブミンと0.05%のNaN₃を含むリン酸緩衝生理食塩水2容量部で洗浄し、更に上記と同様に遠心し、沈澱を0.1%のウシ血清アルブミンと0.05%NaN₃を含むリン酸緩衝

生理食塩水1容量部に浮遊したものを感作ラテックスビーズとした。

第 14 表 (抗原: 亜硝酸塩抽出抗原)

S. mutans 6715 全菌体濃度 (μ g/ μ l)	GBS希釈による抗 β 型抗体 感作ラテックスビーズ				化学結合法による抗 β 型抗体 感作ラテックスビーズ			
	反応時間 (分)				反応時間 (分)			
1.28	+	+	+	+	+	+	+	+
0.64	+	+	+	+	+	+	+	+
0.32	+	+	+	+	+	+	+	+
0.16	+	+	+	+	+	+	+	+
0.080	+	+	+	+	+	+	+	+
0.040	+	+	+	+	+	+	+	+

第 15 表 (抗原: 蒸留抽出抗原)

S. autans 10449 全菌体濃度 (mg/ml)	GBS希釈による抗c型抗体 感作ラテックスビーズ					蒸留水希釈d吸収抗c型抗体 感作ラテックスビーズ				
	反 応 時 間 (分)					反 応 時 間 (分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
1.28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.64	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.32	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.16	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.080	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.040	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.020	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.010	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.005	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

第14～15表の結果より、化学結合法による感作ラテックスビーズは物理吸着法による感作ラテックスビーズと同様の効果を有すること、また蒸留水で希釈した免疫グロブリン感作ラテックスビーズは感度が高いことが知見された。

出願人 ライオン株式会社
代理人 弁理士 小 島 隆 司

第 16 表

蒸 留 抽 出 抗 原 (全菌体濃度 10mg/ml)	GBS希釈による抗c型抗体 感作ラテックスビーズ					蒸留水希釈d吸収抗c型抗体 感作ラテックスビーズ				
	反 応 時 間 (分)					反 応 時 間 (分)				
	5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
S. autans E49 (a)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans FA-1 (b)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans 10449 (c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. autans B13 (d)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans MT703R (e)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans ON2175 (f)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans 6715 (g)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
S. autans MFe28 (h)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+